

機関番号：22701
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790778
 研究課題名（和文） 免疫調節性 DNA とナノ・マイクロ粒子キャリアーを用いた吸入型 DNA 治療薬の開発
 研究課題名（英文） Development of inhaled biodegradable nano/micro-particles incorporated immuno-modulatory DNA for treatment of inflammatory lung diseases
 研究代表者
 佐藤 隆 (SATO TAKASHI)
 横浜市立大学・医学部・助教
 研究者番号：70510436

研究成果の概要（和文）：

難治性肺疾患の進行予防ならびに改善を目的とした吸入型合成 DNA 治療薬の開発を念頭に置き、まず DNA の徐放製剤化による、創傷治癒促進/再上皮化への効果を免疫組織学的/分子生物学的に実証し学術誌に発表ならびに米国特許申請した。この結果をもとに、炎症巣での効果的な放出特性を有する pH 依存性キャリアーの開発に注力し、生分解性を有するナノサイズキャリアーと免疫刺激性/免疫抑制性合成 DNA（分子量 4,500-7,500）の複合体からなるポリケタル粒子を開発した。

研究成果の概要（英文）：

Recently we have developed biomaterials incorporated oligodeoxynucleotide (ODN) achieving acceleration of epithelial cell repair. In this regard, we focused on the effective delivery of ODN to pulmonary immune cells such as alveolar macrophages and bronchial associated lymphoid tissue. Finally, we synthesized biodegradable polyketal nano-particles containing ODN, which showed sustaining-hydrolyzed and preferably degraded in acidic condition. Thereby, we could extend our studies in the local administrative inhaled approach in lung inflammation study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：免疫調節性DNA、ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

多くの呼吸器疾患の病態は、外界と接する気道に存在する免疫担当細胞を介して成立するが、感染症、アレルギー、自己免疫疾患、間質性肺疾患などさまざまな疾患で、その病変形成に独自の気道粘膜免疫機構として存在する気管支随伴リンパ組織

（Bronchus-associated lymphoid tissue: BALT）の関与が報告されている。しかしながら、このような気道粘膜免疫系をターゲットとする研究はまだ発展途上である。今回、治療薬として提案した免疫調節性 DNA は安価で大量に、かつ高純度で生成可能であり、我々は酸化ストレス肺障害モデル等で炎症抑制

効果を確認し報告している。これらの知見をもとに、DNA 認識レセプターを介した炎症応答の調節、血管新生物質の発現誘導、創傷治癒促進により慢性炎症・組織破壊が関与した難治性・進行性疾患に対する治療への応用が期待されると考えた。しかしながら、BALT を介した疾患活動性制御の研究は発展途上であり、効果的なデリバリーシステムの構築と局所での免疫応答の作用機序解明が課題である。

2. 研究の目的

難治性肺疾患の進行予防ならびに改善を目的とした吸入型合成免疫調節性 DNA 治療薬の開発に向けた基盤研究を行う。免疫調節性 DNA 治療薬の標的組織を、疾患活動性に関わる気道粘膜免疫系とし、pH 依存性生分解特性を有するナノ粒子との複合体による効果的なデリバリーシステムの構築と気道免疫細胞に対する作用機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究は以下の流れで施行した。

- ① 気道上皮創傷モデルに対する徐放化免疫調節性 DNA の創傷治癒促進効果の検証 (2009 年度)」
- ② 「polyketal nanoparticles への核酸成分包埋によるナノ・マイクロ粒子キャリアーによる吸入免疫調節性 DNA 治療薬の開発 (2009~2010 年度)」
- ③ 「ナノ・マイクロ粒子キャリアーによる気道上皮細胞、気道粘膜免疫細胞における安全性、免疫応答機構を解析 (2010 年度)」

以上について、細胞分子レベルで *in vitro* および *in vivo* 両面から解析する。(下図参照)

4. 研究成果

本研究は、これまでの知見を基盤とし、合成 DNA と運搬体を融合した複合体を構築したうえで、気道上皮/免疫細胞試験 (*in vitro*) から経気道的投与試験 (*in vivo*) に至るまで特異的受容体を介在するサイトカインネットワークの観点から総合的に解明することを目標としている。最終的に気道炎症局所にて効果を発揮する安全な吸入治療薬の開発を目指す。その上で、以下の点について特に注目し明らかにする。

DNA による免疫調節は一過性であり、現状

では持続した効果を得るためには定期的な投与が必要である (Klinman et al. Clin Immunol 2003)。そこで、研究代表者らが作成した DNA の徐放化が可能な Basement membrane extract incorporated DNA (図 1 参照, Sato et al. Wound Repair Regen 2010; より引用) の吸入応用を目指す

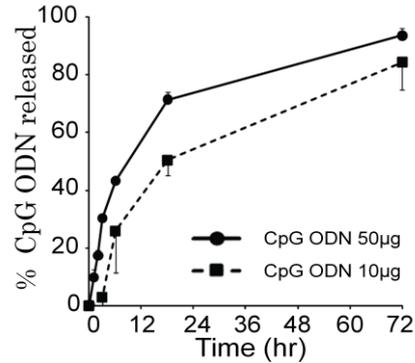


図 1 徐放化ゲルの DNA 放出特性

- ① この徐放化ゲルを用いた新規 *in vitro* 創傷治癒モデル (図 2 参照) を利用した、免疫刺激性 DNA による創傷治癒促進効果を報告した (学会発表 1) ~3)) 。

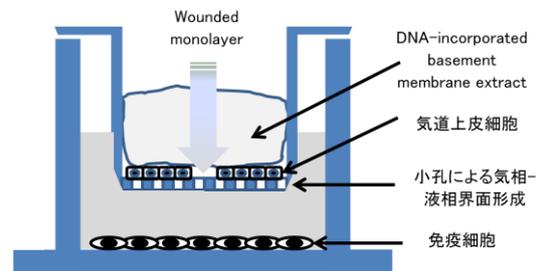


図 2 Transwell を用いた新規 *in vitro* 創傷治癒モデル

上記の新規システムを利用した気道上皮創傷モデルに対して徐放化した免疫刺激性 DNA は、単回投与でマウス気道上皮細胞株 (MM14) の創傷治癒促進効果を示した (図 3 参照)。創傷治癒促進に関与する因子として、免疫刺激性 DNA による一酸化窒素産生の亢進、EGFR の活性化が示唆され、現在解析をすすめている。

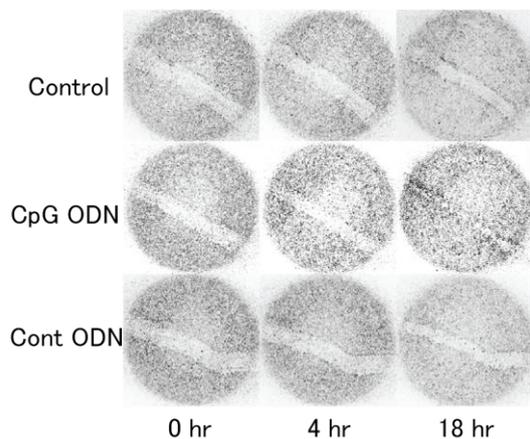
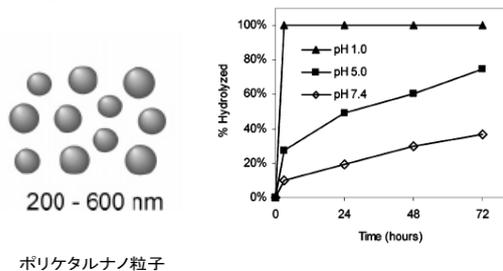


図3 徐放化免疫刺激性 DNA によるマウス気道上皮創傷治癒促進効果

② polyketal (図4参照) の合成に関しては 1,4-Benzenedimethanol (5g, 36mmol) のトルエン(50ml)添加、ならびに p-toluenesulfonic acid (260mg を酢酸エチル 1ml に溶解) の添加。さらに 2,2-dimethylpropane (4.5ml, 37mmol) の添加で合成反応を開始することで、既出の文献で報告されているよりも高収率(収率 10%程度)を得た。つづいて、polyketal を主成分とする DNA を含有した W/O/W エマルジョンの作成を検討した。界面活性剤は PEG 系でエマルジョンの作成が悪かったためポリビニルアルコール (PVA) を使用した。ポリケタルと DNA の fusion particle 作成に関しては DNA と同濃度の 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP) を作用させた後、ポリケタル-PVA 溶液に添加後、遠心凍結乾燥により回収した。Polyketal-DNA particles の細胞毒性は MTT アッセイにより解析し、DNA 単体での Half maximal (50%) inhibitory concentration (IC50) と同等の細胞障害性にとどまり、実験で使用する濃度 (<3 μmol) での細胞毒性はみられず、動物実験での使用に際して問題ないと考えられた。



ポリケタルナノ粒子

図4 ポリケタルナノ粒子と分解特性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1) Yamamoto M, Sato T, Baren J, Verthelyi D, and Klinman DM

The acceleration of wound healing in primates by the local administration of immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Biomaterials*. 2011;32:4238-4242

2) Sato T, Yamamoto M, Shimosato T, and Klinman DM

Accelerated wound healing mediated by activation of Toll-like receptor 9. *Wound Repair Regen*. 2010;18:586-593

3) Shimosato T, Fujimoto M, Tohno M, Sato T, Tateo M, Otani H, Kitazawa H

CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394:81-86

4) Klinman DM, Tross D, Klaschik S, Shirota H, and Sato T

Therapeutic application and mechanisms underlying the activity of immunosuppressive oligonucleotides. *Ann NY Acad Sci*. 2009;1175:80-88

5) Shimosato T, Tohno M, Sato T, and Kitazawa H.

Identification of a potent immunostimulatory oligodeoxynucleotide from the *Streptococcus thermophilus* lacZ. *Anim Sci J*. 2009;80:597-604

6) Klinman DM, Klaschik S, Sato T, Tross D

CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61:248-255

[学会発表] (計5件)

1) Sato T, Miyazawa N, Klinman DM, Shimosato T, Yamamoto M, and

Ishigatsubo Y

CPG Oligodeoxynucleotides Promote Wound Healing In Airway Epithelial Cells.

Am J Respir Crit Care Med 2011;183:A2087

2) Sato T, Shimosato T, Yamamoto M, Kobayashi N, Miyazawa N, and Klinman DM Accelerated wound healing in mice by local administration of sustained-release CpG oligodeoxynucleotide.

97th American Association of Immunologist Annual Meeting 2010

J Immunol 2010;184:136.4

3) Sato T, Shimosato T, and Klinman DM CpG oligodeoxynucleotide incorporated basement membrane extract facilitate wound repair in mice.

96th American Association of Immunologist Annual Meeting 2009

J Immunol 2009;182:135.5

4) Shimosato T, Tohno M, Sato T, Kitazawa H

CpG oligodeoxynucleotide from Streptococcus thermophilus regulates anti-inflammatory responses

ADSA-CSAS-ASAS2009 Joint Annual Meeting 2009

5) Shimosato T, Tohno M, Sato T, Tateo M, Otani H, Kitazawa H

CpG oligodeoxynucleotide from Streptococcus thermophilus lacZ strongly induces the expression of interleukin-33 in murine immune cells

The 9th World Congress on Inflammation ,

The 9th World Congress on Inflammation

Book of Abstracts 2009 ; 58:120-121

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : USE OF CPG OLIGODEOXYNUCLEOTIDES TO INDUCE EPITHELIAL CELL GROWTH

発明者 : Sato Takashi and Klinman Dennis

権利者 : Sato Takashi and Klinman Dennis

種類 :

番号 : PCT/US 12/205, 756

出願年月日 : 2009 年 4 月 16 日

国内外の別 : 国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.yokohama.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 隆 (SATO TAKASHI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号 : 70510436

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :